

**СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ВЕКТОРА
СЕРИИ РЕТ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА КАПСИДНОГО
БЕЛКА ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
В ШТАММАХ *E. COLI***

*Кудин Кирилл Валерьевич, м.н.с. НИЛ биотехнологии,
Сауткина Наталья Владимировна, ассистент,
Адамонис Яна Викторовна, студент,
Прокулевич Владимир Антонович, д.б.н., профессор,
заведующий кафедрой микробиологии
Белорусский государственный университет*

Введение. Вирусная диарея крупного рогатого скота вызывается группой вирусов BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus), относящихся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирус BVDV связан с желудочно-кишечными, респираторными и репродуктивными заболеваниями крупного рогатого скота, приводящими к значительным экономическим потерям в основном из-за снижения репродуктивных характеристик животных. Вирион BVDV 2-го типа представляет собой нуклеокапсид с заключенной внутри одноцепочечной геномной РНК, окруженный липидной оболочкой со структурными вирусными гликопротеинами, из которых гликопротеин E2 является иммунодоминантным антигеном. Фрагмент открытой рамки считывания генома BVDV, кодирующий белок E2 внешней оболочки вириона, ранее был клонирован в векторе pUC18 и секвенирован [1]. Целью работы являлось переклонирование данного гена в вектор серии pET для экспрессии белка E2 в бактериальных клетках.

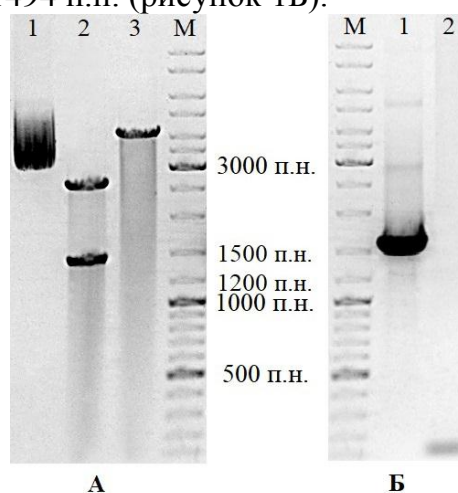
Материалы и методы. Для создания экспрессионной конструкции открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую белок E2, переносили из промежуточного вектора pUC18-BVDV [1] в вектор pET-24b(+) (Novagen). Клонирование полученной рекомбинантной плазмиды проводили с использованием стандартных методик [2] в клетках штамма *E. coli* XL-1 Blue. ПЦР и рестрикцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя используемых ферментов (Thermo Fisher Scientific Inc.), если не указано иное. Характеристики использованных в работе праймеров приведены в таблице.

Таблица – Характеристики использованных праймеров

Праймер	Последовательность 5'→3'	Размер, п.н.	Фермент	Температура отжига, °С
M13-F	tgtaaacgacggccagt	18	–	50
M13-R	caggaaacagctatgacc	18		
BVDV-ORP-F	gatata cata tgggcagcttcctgaatgcaaagag	36	NdeI	62
BVDV-Short-S-R	gtggtg ctc gagttagaacactgagaagtagtctttg	37	XhoI	

Примечание – сайты узнавания рестриктаз подчеркнуты, дополнительные нуклеотидные последовательности вектора pET-24b(+), примыкающие к сайтам рестрикции, выделены жирным шрифтом.

Результаты и их обсуждение. Предварительный рестрикционный анализ вектора pUC18-BVDV осуществляли с использованием рестриктаз HindIII и EcoRI. Ожидаемый размер клонированной вставки составил 1442 п.н. (рисунок 1А). Для проведения ПЦР-анализа применяли *Taq*-полимеразу и универсальные праймеры M13-F и M13-R (таблица 1), комплементарные области полилинкера вектора pUC18. Размер ожидаемого продукта ПЦР составил 1494 п.н. (рисунок 1Б).



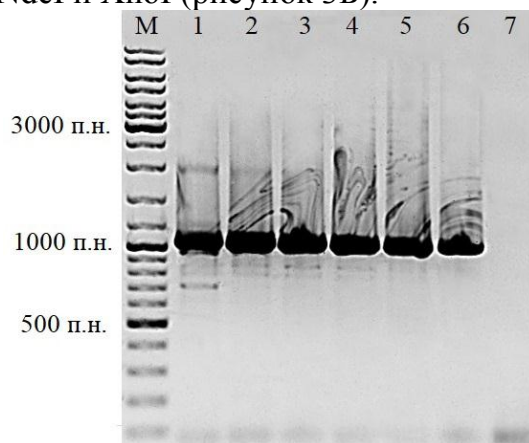
А: 1 – нативный вектор pUC18-BVDV; 2 – вектор pUC18-BVDV, обработанный рестриктазами HindIII и EcoRI; 3 – вектор pUC18-BVDV, обработанный рестриктазой EcoRI; Б: 1 – продукт амплификации с праймерами M13-F и M13-R и матрицей pUC18-BVDV; 2 – отрицательный контроль (без матричной ДНК); М – маркеры молекулярного веса ДНК SM 0333 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов рестрикционного анализа (А) и ПЦР-анализа (Б) вектора pUC18-BVDV

Амплификацию фрагмента ОРС генома BVDV проводили методом ПЦР с использованием *Pfu*-полимеразы и праймеров BVDV-ORP-F и BVDV-Short-S-R (таблица 1). При проведении амплификации с теоретически рассчитанными параметрами фрагмент ДНК накапливался неэффективно. При оптимизации температуры отжига праймеров было установлено, что наибольший выход целевого ампликона при минимальном уровне неспецифических продуктов наблюдался при температуре отжига 62 °С,

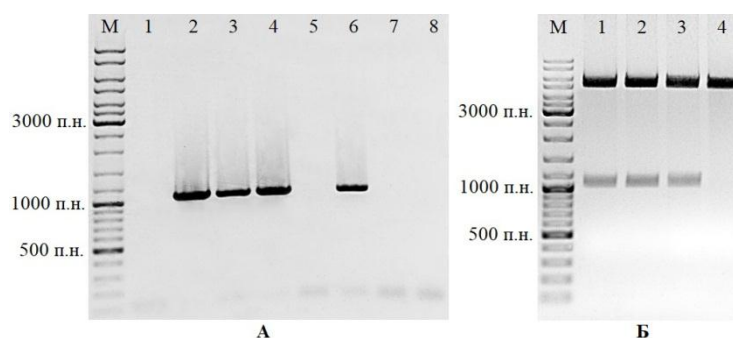
размер продукта амплификации составляет 1053 п.н. (рисунок 2). Дополнительно для повышения специфичности и эффективности реакции использовали «горячий старт», а также увеличенное время элонгации цепи (2 мин 30 сек при 72 °C).

Полученный ампликон очищали, лигировали с вектором pET-24b(+) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI и трансформировали им клетки штамма *E. coli* XL-1Blue. Полученные клоны трансформантов проверяли на наличие вставки в рекомбинантном векторе ПЦР-анализом с использованием праймеров BVDV-ORP-F и BVDV-Short-S-R (рисунок 3А). Векторную ДНК, выделенную из положительных клонов, проверяли рестрикционным анализом ферментами NdeI и XhoI (рисунок 3Б).



М – маркер молекулярного веса ДНК SM 0333 (Thermo Fisher Scientific Inc.); 1–6 – продукты амплификации матрицы при температурах 46, 50, 54, 58, 62 и 66 °C соответственно; 7 – отрицательный контроль (без матричной ДНК).

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов оптимизации амплификации фрагмента ОРС генома BVDV



А: 1 – отрицательный клон; 2, 3, 4 – положительные клоны; 5 – отрицательный контроль (без матричной ДНК); 6 – положительный контроль (вектор pUC18-BVDV); 7 – отрицательный контроль (клетки штамма *E. coli* XL-1 Blue без плазмиды); 8 – вектор pET-24b(+) (отрицательный контроль), Б: 1, 2, 3 – вектор pET-BVDV, выделенный из трех положительных клонов и обработанный рестриктазами NdeI и XhoI; 4 – отрицательный контроль (вектор pET-24b(+), обработанный рестриктазами NdeI и XhoI); М – маркер молекулярного веса SM 0333 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа (А) и рестрикционного анализа (Б) клонов *E. coli* XL-1 Blue pET-BVDV

Таким образом, в клетках штамма *E. coli* XL–1Blue в составе вектора рЕТ–24b(+) была клонирована последовательность ОРС, кодирующая капсидный белок Е2 вируса BVDV 2–го типа.

Список использованных источников

1. Кудин, К.В. Получение фрагмента генома вируса диареи крупного рогатого скота / К.В. Кудин, П.П. Красочко, В.А. Прокулевич // Вестник БГУ. – 2014. – Серия 2, № 2. – С. 58–62.
2. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.